

Aus dem Institut für Biochemie und Endokrinologie
der Justus-Liebig Universität zu Gießen
(Direktor: Professor Dr. Dr. W. Boguth)

**Zur Regulation der alkalischen
Leukozytenphosphatase-Aktivität bei der Ratte
in Abhängigkeit von weiblichen Keimdrüsenhormonen
und vom allgemeinen Stoffwechselgeschehen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus-Liebig Universität zu Gießen

Eingereicht von
Ute Achterrath
Tierärztin aus Essen

Gießen 1970

Aus dem Institut für Biochemie und Endokrinologie
der Justus-Liebig Universität zu Gießen
(Direktor: Professor Dr. Dr. W. Boguth)

**Zur Regulation der alkalischen
Leukozytenphosphatase-Aktivität bei der Ratte
in Abhängigkeit von weiblichen Keimdrüsenhormonen
und vom allgemeinen Stoffwechselgeschehen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus-Liebig Universität zu Gießen

Eingereicht von
Ute Achterrath
Tierärztin aus Essen

Gießen 1970

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
GIESSEN



Dekan: Professor Dr. H. Tillmann
Berichterstatter: Professor Dr. Dr. W. Boguth
Tag der mündlichen Prüfung: 9.6.1970

Inhaltsverzeichnis

1.0	<u>Einleitung</u>	S. 1
2.0	<u>Literaturübersicht</u>	S. 2- 16
2.1	Phosphatasen- Einteilung und Wirkungs- weise	S. 2
2.2	Alkalische Leukozytenphosphatase (ALP) - Lokalisation und physiologische Funktion-	S. 3
2.3	Genetische Regulation und normale Aktivität der ALP	S. 6
2.4	Veränderungen der ALP- Aktivität	S. 7
2.41	Genetische Defekte und Erkrankungen des blutbildenden Systems	
2.42	Infektionskrankheiten, pyrogene Sub- stanzen	S. 10
2.43	ACTH, Steroide	S. 12
2.5	Nachweismethoden der ALP	S. 15
3.0	<u>Material</u>	S. 17
3.1	Geräte	
3.2	Substanzen	
4.0	<u>Methoden</u>	S. 19
4.1	Injektionslösungen	
4.2	Färberische Darstellung der ALP- Akti- vität	
4.3	Vaginalabstriche	
5.0	<u>Ergebnisse</u>	S. 21- 57
5.1	Versuche an normalen Ratten	S. 21- 30
5.11	Männliche Ratten	
5.12	Weibliche Ratten- Vergleich mit der Zyklusphase	
5.13	Ovariektomierte Ratten	
5.14	Corticosteron	
5.15	Oestradiolbenzoat, Progesteron	
5.16	Trijodthyronin	
5.17	Thyreotropin	
5.18	Thyreotropin und Oestradiolbenzoat	

5.2	Versuche an Vitamin- E- Mangel Ratten	S. 31- 33
5.21	Normaler Index	
5.22	Oestradiolbenzoat	
5.23	Trijodthyronin	
5.3	Versuche an PTU- vorbehandelten Rat- ten	S. 34- 36
5.31	Verhalten des Index auf PTU- Behand- lung; Behandlung der unter PTU stehen- den Ratten mit Oestradiolbenzoat	
5.4	Versuche an hypophysektomierten Rat- ten	S. 36- 38
5.41	Verhalten des ALP- Index auf Thyreotropin, Oestradiolbenzoat und Kombination von TSH mit Oestradiolbenzoat	
5.5	Tabellen	S. 39- 57
6.0	<u>Diskussion</u>	S. 58
7.0	<u>Zusammenfassung</u>	S. 64
	Literaturverzeichnis	S. 65

1.0 Einleitung

Seit 1907 zum ersten Mal eine alkalische Phosphatase entdeckt wurde und ROBINSON 1923 über die Fähigkeit des wachsenden Knochens, Zuckerphosphate zu spalten und Phosphationen freizusetzen, berichtete, sind zahlreiche verschiedene Organphosphatasen beschrieben und isoliert worden.

In klinischer Sicht findet vor allem die alkalische Serumphosphatase Beachtung, deren Bestimmung nach HUGGINS und TALALAY zur Diagnose von Stoffwechselerkrankungen des Knochens in der Humanmedizin üblich ist.

In den letzten Jahren gewinnt auch die alkalische Leukozytenphosphatase in zunehmendem Maße Interesse, nachdem klinisch leicht durchführbare Methoden zur Aktivitätsbestimmung im einfachen Blutausschreibpräparat durch GOMORI und TAKAMATSU, KAPLOW und MERKER entwickelt wurden.

Es liegen eine Reihe von Arbeiten aus der Humanmedizin vor, die die Möglichkeit einer diagnostischen Auswertung der Aktivitätsbestimmung der alkalischen Leukozytenphosphatase bei Erkrankungen des blutbildenden Systems andeuten.

Eine Beeinflussung der Enzymausstattung der Neutrophilen soll durch verschiedene humorale Stoffe insbesondere Steroidhormone geschehen. Es wird auch über zyklische Schwankungen der ALP-Aktivität während des menstruellen Zyklus und über Aktivitätsanstiege während der Schwangerschaft bei der Frau berichtet.

Aus keiner der vorliegenden Arbeiten geht hervor, ob eine direkte und spezifische Beeinflussung der ALP-Aktivität durch weibliche Steroidhormone bewirkt wird, oder ob die gesteigerte Aktivität der alkalischen Leukozytenphosphatase lediglich Ausdruck einer allgemeinen Stoffwechselzunahme ist.

BAUER-SIC erwähnt diese Problematik kurz in einer ihrer Arbeiten und regt eine Untersuchung zu diesem Thema an.

Diese Arbeit stellt einen Versuch dar, die Regulation der ALP-Aktivität in Abhängigkeit von weiblichen Steroidhormonen und vom allgemeinen Stoffwechselgeschehen zu klären.

2.0 Literaturübersicht

2.1 Phosphatasen, Einteilung und Wirkungsweise

Unter Phosphatasen hat man hydrolysierende Enzyme des Phosphatstoffwechsels zu verstehen (17).

Nach ihrer Fähigkeit, verschiedene Bindungen zu spalten, unterscheidet man (12)

- a) wahre Phosphatasen, die Esterbindungen zwischen Phosphat und einem alkoholischen oder Säureanhydridrest spalten, ($C-O-P$), und bei denen man wiederum in Phosphomonoesterasen und Phosphodiesterasen trennt;
- b) Pyrophosphatasen, die $P-O-P$ Bindungen und
- c) Phosphoamidasen, die $N-P$ Bindungen angreifen.

Eine weitere Einteilung richtet sich nach dem im vitro gefundenen pH-Optimum der Spaltungsreaktion, so daß wir grundsätzlich zwischen sauren - mit pH-Optimum im sauren Bereich - und alkalischen Phosphatasen - mit pH-Optimum im alkalischen Bereich - unterscheiden müssen. Sie greifen dieselben Substrate an und werden darum auch als "isodyname Phosphatasen" bezeichnet (19).

Weiterhin ist eine Unterteilung nach der Substratspezifität üblich. Demnach unterscheiden wir "unspezifische Phosphatasen", die eine große Anzahl verschiedener Phosphate hydrolysieren und "spezifische Phosphatasen", die nur einen einzigen Ester oder eine kleine Gruppe chemisch nahe verwandter Ester angreifen (12).

2.2 Alkalische Leukozytenphosphatase - Lokalisation und physiologische Funktion

Die alkalische Leukozytenphosphatase ist eine substratunspezifische Phosphomonoesterase mit pH-Optimum bei 9,4 (22).

Sie spaltet Orthophosphat von zahlreichen alkoholischen und phenolischen Monoestern ab.

Es wird für sämtliche unspezifische Phosphomonoesterasen vermutet, daß sie unter physiologischen Bedingungen auch Transphosphorylierungs- und Synthesevorgänge katalysieren (25), das Reaktionsgleichgewicht aber so stark auf Seiten der Hydrolyse liegt, daß die Synthese- und Transphosphorylierungsvorgänge kaum faßbar sind (38).

Das Enzymprotein weist in der Stärkegel-Elektrophorese drei charakteristische Bänder von Isoenzymen auf (30, 44).

Sie werden nach der Wanderungsgeschwindigkeit als "slow" (S), "intermediate" (I) und "fast" (F) Isoenzyme bezeichnet.

Jeder Leukozytenextrakt hat dabei verschiedene Haupt- und Nebenbänder. Es gelang WEAVER et al. nicht, eine Beziehung zwischen Isoenzym-Bändern und Leukozytenzahl, histochemisch festgestelltem ALP-Index, Alter oder Geschlecht herzustellen (44).

BOTTOMLEY et al. isolierten und reinigten die ALP durch n-Butylalkohol-Extraktion und Agarose-Säulenchromatographie. Das Molekulargewicht für alle drei Isoenzyme ist nach ihren Ergebnissen 650 000 (7).

Nahezu alle reifen neutrophilen Granulozyten sind mit alkalischer Phosphatase ausgestattet (22), die neben anderen Enzymen in den spezifischen Granula der Neutrophilen vorkommt (3).

Die Determination der späteren Enzymaktivität geschieht wahrscheinlich ausschließlich im Knochenmark (28), wogegen die endgültige Aktivität erst in der Peripherie erworben wird (24). Die in den neutrophilen Myelozyten vorkommenden azurophilen Granula werden mit zunehmender Reifung durch sogenannte "dielektronische", d.h. mit sauren oder basischen Farbstoffen nicht anfärbbare Granula ersetzt, welche die spezifischen Granula der reifen Neutrophilen darstellen.

Mit histochemischen Nachweismethoden ist es an Kaninchen-knochenmarkspunktaten gelungen, die azurophilen Granula als Sitz der sauren, die dielektronischen Granula als Sitz der alkalischen Leukozytenphosphatase zu identifizieren (15). Diese Befunde stimmen mit anderen Beobachtungen überein, nach denen in den unreifen Vorstufen der Granulozytopoese im peripheren Blut überwiegend saure, in den reifen Neutrophilen dagegen vorwiegend alkalische Phosphatase lokalisiert ist (3).

Die ALP gilt als Enzym des Funktionsstoffwechsels der neutrophilen Granulozyten, analog der Funktion der alkalischen Phosphatasen des Darmepithels, des Nierenepithels und der Leberzellen, die Aufgaben bei der Aufnahme oder Sekretion von Stoffen erfüllen (15).

Diese Annahme wird bestätigt durch Beobachtungen von PLENERT, der bei einer systematischen Untersuchung von Eiterleukozyten und im Leukozytenemigrationstest eine auffallend niedrige bis fehlende Fermentaktivität im Vergleich zu den Strombahnneutrophilen feststellen konnte (28).

Eine Beteiligung der ALP bei der Phagozytose ist wahrscheinlich, da bei Aufnahme von Mikroorganismen eine Degranulation der polymorphkernigen Granulozyten stattfindet, durch welche Enzyme und Phagozytin aus den Granula freigesetzt (13) und extrazellulär abgegeben werden (9).

2.3 Genetische Regulation und normale Aktivität der ALP

"Die normale Aktivität der ALP stellt eine Reizantwort des granulozytären Abwehrapparates auf ständige Auseinandersetzung und Kontakt mit humoralen Mittlersubstanzen, Toxinen, Zerfallsprodukten, sonstigen Substanzen und auch mit hormonalen Regulatoren dar." (22).

Der Ort der Enzymregulation scheint auf dem Chromosom 21 zu liegen, da bei Auftreten des Philadelphia-Chromosoms, eines mit Veränderungen der chromosomalen Substanz im Chromosom 21 einhergehenden genetischen Defektes, eine auffallend erniedrigte Enzymaktivität vorliegt (11, 14, 39, 41).

Beim einzelnen gesunden erwachsenen Menschen hält sich die Aktivität in geringen Grenzen konstant, jedoch gibt es erhebliche individuelle Unterschiede (4).

Der durchschnittliche normale ALP-Index beträgt 10 - 100 (22), bei gesunden Kindern 5 - 100 (35). Die neutrophilen Granulozyten des Menschen sind selten positiv (3).

Fast alle neutrophilen Granulozyten des Pferdes sind mit Enzym ausgestattet (3).

Beim Rind findet sich alkalische Leukozytenphosphatase nur in den Zellen der neutrophilen Granulozytopoese, während alle anderen Leukozyten negative Reaktion zeigen. Der Index variiert bei den durch BAUER-SIC untersuchten Rindern zwischen 226 und 388. Viele Neutrophile sind positiv. Die dem Knochenmark entnommenen Granulozyten des Rindes weisen einen höheren Index auf (3). Dagegen wird bei Knochenmarksneutrophilen des Menschen eine niedrigere Aktivität als bei Strombahnneutrophilen beobachtet (22).

Bei Hund und Katze ist eine noch geringere Enzymausstattung als beim Menschen vorhanden (3).

2.4 Veränderungen der ALP-Aktivität

2.41 Genetische Defekte und Erkrankungen des blutbildenden Systems

Untersuchungen der ALP-Aktivität bei Erkrankungen des blutbildenden Systems ergeben ein recht unterschiedliches Bild.

Bei der chronischen myeloischen Leukämie des Menschen ist die auftretende niedrige ALP-Aktivität beinahe pathognostisch (11, 18) und durch einen echten Fermentdefekt im Zusammenhang mit dem Auftreten des Philadelphia-Chromosoms bewirkt (18, 22, 23, 39, 41).

An chronisch myeloischer Leukämie erkrankte Patienten weisen im fortgeschrittenen Stadium auf ACTH und Hydrocortison trotz

erhöhter Granulozytenzahl keine Aktivitätssteigerungen auf, während im Frühstadium der Erkrankung eine normale Reaktion stattfinden soll (27, 42). Auch durch Gabe von Pyrogen ist bei diesen Patienten keine Aktivitätssteigerung erzielbar (27). Eine sich erhöhende ALP-Aktivität bei chronisch myeloischer Leukämie soll dagegen prognostisch günstig und kennzeichnend für die Fälle sein, die auf zytostatische Therapie ansprechen, und bei denen eine normale Granulozytopoese in Gang gebracht wird (27). Zytostatika scheinen den Fermentdefekt aufzuheben (42).

Die elektrophoretische Untersuchung der Isoenzyme ergibt bei dieser Erkrankung eine charakteristische Veränderung oder Verminderung des S-Isoenzyms, so daß lediglich ein I-Band nachweisbar ist (30, 44).

Mongolismus, ebenfalls ein genetischer Defekt mit dreifachem Chromosom 21 soll eine konstante Aktivitätserhöhung zeigen (22). Die Isoenzyme unterscheiden sich in keiner Weise von denen gesunder Menschen (30).

Die übrigen menschlichen Leukosen gehen mit einer mehr oder weniger deutlichen Aktivitätserhöhung einher (6, 22, 23). Im Unterschied zu diesen Befunden beim Menschen konnten bei der Leukose des Rindes keine Aktivitätsabweichungen nachgewiesen werden (2).

Eine Aktivitätserhöhung kommt auch bei Osteosklerose und Myelofibrose des Menschen konstant vor (18, 22, 41).

Von den Polyglobulien weist nur die Polycythaemia vera eine konstante, diagnostisch verwertbare Aktivitätssteigerung auf (18, 22, 23). Das F-Isoenzym ist vermindert (30, 44). Die sekundäre Polycythaemie zeigt normale Aktivitäten (22).

Die menschlichen Retikulosen gehen mit erhöhten ALP-Aktivitäten einher. Der Index liegt zwischen 100 und 200 (23).

Eine deutliche Aktivitätssteigerung findet sich besonders bei progressiver Erkrankung (6, 22), wobei erhöhte Indices den klinischen Symptomen um Monate vorausseilen können (6).

Normale Indices sind Zeichen ruhender oder in Remission befindlicher Erkrankung (6).

Die verschiedenen menschlichen Anämieformen weisen wenig konstante Aktivitätsverminderungen der ALP auf (22).

Bei der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie des Menschen soll ein echter Fermentdefekt mit konstanter Aktivitätserhöhung vorliegen (22). Bei elektrophoretischer Untersuchung der Isoenzyme befindet sich das F-Band charakteristisch für diese Erkrankung nahe 4,5 cm von der Anode entfernt (30).

Ganzkörperbestrahlungen mit Veränderungen des blutbildenden Systems ergeben bei Ratten eine stark verminderte ALP-Aktivität (1).

2.42 Infektionskrankheiten, pyrogene Substanzen

Infektionskrankheiten bewirken unterschiedliche Veränderungen der ALP-Aktivität.

Bei reinen Viruserkrankungen liegt eine normale ALP-Aktivität vor, bei Virusinfektionen mit bakteriellen Komplikationen dagegen eine starke Indexerhöhung (35, 37).

Übereinstimmend damit wurden durch SRAMKOVA et al. bei Pertussis-, Masern- und Pockenschutzimpfungen keine signifikanten ALP-Aktivitätssteigerungen gefunden. Leichte Aktivitätsanstiege blieben im normalen Bereich und fielen mit klinisch nachweisbaren Impfsymptomen zusammen. Bei nicht exsudativen Impfkomplicationen werden die Aktivitäten ebenfalls nicht deutlich gesteigert, während bei septischen und nekrotischen Komplikationen deutliche Aktivitätserhöhungen eintreten (34). Differierend zu diesen Befunden sollen bei Zeckenencephalitiden ebenso stark erhöhte ALP-Indices vorliegen wie bei eitrigen Meningitiden (35).

Vor allem bakterielle Infektionen zeigen deutlich gesteigerte ALP-Aktivitäten (35).

Nicht völlig übereinstimmend mit diesen Befunden berichten SIERING et al. über normale Aktivitäten bei Tuberkulose, wobei aber die mehr exsudativen Formen ALP-Erhöhungen aufweisen sollen. Die ALP-Aktivität ist außerdem deutlich gesteigert, wenn andere, exsudative Erkrankungen zur gleichen Zeit vorhanden sind (33). Bei tuberkulöser Meningitis soll keine Aktivitätserhöhung vorliegen (36). Leptospiren-Meningitiden zeigen variierende Befunde (36).

Durch Gabe bakterieller Endotoxine wird bei blutgesunden Menschen eine Zunahme der Phosphataseaktivität in den Neutrophilen hervorgerufen (22, 24, 27, 28), wobei Granulozytenzahl und Aktivität in keiner Beziehung zueinander stehen (27, 28, 33, 40). Die Aktivitätssteigerung hält über die Granulozytose hinaus an (22, 24).

Auch bei Gewebszerfall und stark einschmelzenden Tumoren liegt eine erhöhte ALP-Aktivität vor (22).

2.43 ACTH, Steroide

ACTH und Hydrocortison bewirken beim gesunden Menschen eine starke Aktivitätszunahme der ALP (22, 42). Auf Cortison in sehr hohen Dosen reagieren dagegen die Granulozyten bei maximaler Granulozytose mit Aktivitätsabfall (28).

Bei MORBUS ADDISON liegt verminderte ALP-Aktivität vor;
Hydrocortison steigert den ALP-Index beträchtlich (42).

Panhypopituitarismus zeigt eine starke Aktivitätszunahme auf ACTH; der Anstieg des ALP-Index auf Hydrocortison ist stärker als bei MORBUS ADDISON (42).

Nach totaler Adrenalektomie erfolgt keine Reaktion auf ACTH, wohingegen deutlich Indexsteigerung durch Hydrocortison erzielbar ist (42).

Adrenalinsuffizienz zeigt deutliche Aktivitätszunahme sowohl auf ACTH als auch auf Hydrocortison (42).

Primärer Aldosteronismus spricht nach Entfernung der Adrenalome mit deutlicher Indexsteigerung auf ACTH an (42). Bei adrenogenitalem Syndrom wird eine Erhöhung der ALP-Aktivität erst nach längerer Cortisonbehandlung in hohen Dosen beobachtet (42).

Prednison bewirkt beim Menschen ebenfalls eine Aktivitätszunahme (28). Das F-Isoenzym ist vermindert (44), das Hauptband liegt 3 cm von der Anode entfernt (30). Auf Prednisolon erfolgt eine Aktivitätserhöhung, die sich innerhalb der Streubreite hält (28).

Gegenüber diesen Befunden beim Menschen beobachteten Mc COY et al. beim Kaninchen keine Aktivitätssteigerungen auf Hydrocortison. Gleichzeitige Gabe von Aktinomycin D bewirkt Aktivitätszunahme (21).

An anderer Stelle berichten Mc COY et al. über aktivitätssenkende Wirkung von Hydrocortison beim Kaninchen (10). Durch Prednisolon läßt sich auch beim Kaninchen eine deutliche Aktivitätszunahme erzielen (21).

Die maximal aktivitätssteigernde Wirkung von Steroiden beim Kaninchen soll an das Vorhandensein der Δ 3,4-Ketogruppe im A-Ring und der Acetylgruppe an C₁₇ gekoppelt sein (10).

Während der Schwangerschaft bei der Frau sind vom Beginn an erhöhte Aktivitäten der ALP nachweisbar (4, 5, 22, 26, 29). Das F-Isoenzym ist vermindert (44). Das Hauptband der ALP befindet sich während der letzten drei Schwangerschaftsmonate als I-Band 3 cm von der Anode entfernt (30). Die ALP-Aktivität steigt post partum weiter an (22, 29) und kehrt erst etwa 6 Wochen nach der Geburt auf normale Werte zurück (29). Auch der Fetus zeigt erhöhte Aktivitäten (29).

Im Unterschied zu diesen Befunden beim Menschen konnten bei hochtragenden Kühen keine Aktivitätsabweichungen festgestellt werden (2).

Durch Applikation von Progesteron und progestativ wirkenden Stoffen läßt sich bei der Frau eine den Werten bei der Schwangerschaft ähnliche Aktivitätssteigerung herbeiführen (29).

Mc COY et al. beobachteten beim Kaninchen auf Progesteron eine starke Aktivitätssteigerung der alkalischen Leukozytenphosphatase (21), die den Effekt aller übrigen getesteten Substanzen übertraf (10). Der durch Progesteron hervorgerufene Aktivitätsanstieg wird durch gleichzeitige Applikation von Actinomycin D und Puromycin gehemmt (21).

BAUER-SIC konnte bei der Frau eine Zyklusabhängigkeit der ALP-Aktivität nachweisen. Ovarialextrakt-Behandlung bewirkt einen erhöhten ALP-Index (4). Bei hyperplastischer Entartung des Endometriums bei der Frau liegt eine erhöhte ALP-Aktivität vor (20).

Beim Kaninchen bewirken oestrogene Stoffe einen Anstieg der ALP-Aktivität, der geringer ist als der durch Progesteron hervorgerufene (10).

2.5 Nachweismethoden der ALP

Neben direkten Nachweismethoden, die zur Isolierung (7), elektrophoretischen Trennung (30) und immunologischen Identifizierung (7) der alkalischen Leukozytenphosphatase angewandt werden können, wurden spezifische indirekte Methoden zur Darstellung der Phosphataseaktivität entwickelt. Sie beruhen darauf, daß man der Phosphatase Substrat anbietet und freigesetztes Phosphat oder das zuvor an Phosphat gebundene und nach Abspaltung des Phosphatrestes zur Verfügung stehende Kation nachweist.

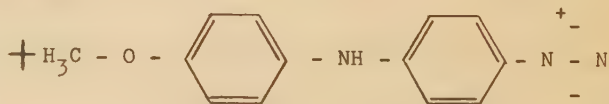
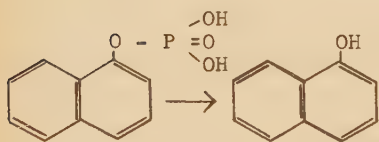
COHN und HIRSCH zerstörten die neutrophilen Granulozyten samt den spezifischen Granula mechanisch und bestimmten die enzymatische Aktivität im mg freigesetzter Phosphor pro Zeiteinheit pro mg Substrat (8).

Eine färberische Darstellung und ohne Zerstörung der Zellen im einfachen Blutaussstrich leicht durchzuführende Bestimmung der Aktivität der alkalischen Leukozytenphosphatase ist dadurch möglich, daß nach Substratzusatz das Phosphation abgespalten wird, und das Kation des Phosphates mit einem geeigneten Anion, das ebenfalls aus der Lösung in die Zelle diffundiert, zu einem unlöslichen, mikroskopisch sichtbaren Niederschlag gekoppelt wird.

Die Originalmethode nach GOMORI zur Bestimmung der alkalischen Phosphatasen wurde durch TAKAMATSU zu einer auf die alkalische

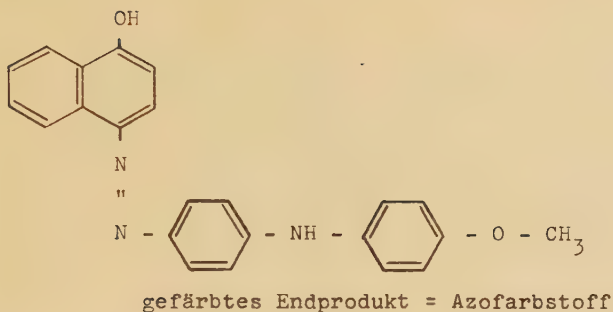
Leukozytenphosphatase anwendbaren Methode modifiziert. Sie stellt eine Succedamethode dar, bei der im ersten Schritt die enzymatische Freisetzung von Phosphationen stattfindet. Die Phosphationen verbinden sich mit metallischen Kationen der Lösung zu einem noch ungefärbten löslichen Reaktionsprodukt. Erst in einem zweiten Schritt bildet sich ein gefärbter Niederschlag, bei dem jedoch nicht die Phosphationen, sondern die zuvor gebundenen metallischen Kationen mit Sulfit-
ionen zu einem unlöslichen Niederschlag ausfallen.

Die Modifikation nach KAPLOW (16) stellt als Simultanmethode eine Vereinfachung des Färbevorgangs dar, bei der in einem einzigen Schritt die enzymatische Freisetzung von Phosphationen und Kupplung des zuvor an Phosphat gebundenen α -Naphthols zu einem in Form kleiner, schwarz-brauner Granula mikroskopisch sichtbaren α -Naptyl-Diazotates erfolgt (23).



Substrat primäres
Reaktionsprodukt

Farbentwickler



Das durch MERKER (22) in Verbindung mit der Methode nach KAPLOW eingeführte Scoring-System bildet die Beurteilungsgrundlage für das gefärbte Präparat.

3.0 Material

3.1 Geräte

Glas-Exsiccator mit Einsatz
Färbeküvetten nach Hellenthal
Färbegestelle aus Glas
Glastrichter
Objektträger
Mettler-Analysenwaage B 5
Zeiss-Mikroskop Standard

3.2 Substanzen

Barbital-Na zur Analyse Merck 6318

Variaminblausalz B conc. nach Gössner

Naphthal - 1 - phosphorsäure-Na

Formalin 6,5 %

Hämalaun nach Mayer Merck 9249

May-Grünwald-Lösung Merck 1424

Giemsa-Lösung Merck 9204

Immersionsöl

Filterpapier Schleicher-Schüll-Schwarzband Nr. 589

Oestradiolbenzoat

Progesteron-Proluton Schering

Corticosteron

TSH-Thyreostimulin Organon T 525

Trijodthyronin

Propylthiouracil

4.00 Methode

4.1 Injektionslösungen

Die zur Injektion notwendigen kleinen Mengen an Oestradiolbenzoat und Progesteron werden durch Verdünnung mit Olivenöl "oliiodante" hergestellt.

Die Injektionslösung von T3 wird durch Lösung der pulverisierten Substanz in Aqua bidest. bereitet.

4.2 Färberische Darstellung der ALP- Aktivität

Azo- Kupplungsverfahren nach KAPLOW (16):

Die lufttrockenen, nicht über zwei Tage alten Blutaussstriche werden in Formoldampf im Exsiccator 10 Minuten fixiert und anschließend gründlich unter fließendem Leitungswasser gespült.

Inkubationslösung: - für zwei Färbeküvetten, stets frisch zubereitet-

140 mg Variaminblausalz B conc. werden in 40 ml 2% veronal- Na - Pufferlösung gegeben.

70 mg Naphthol- 1 - phosphorsäure - Na werden in 100 ml 2% Veronal- Na - Pufferlösung gelöst.

Beide Lösungen zusammengeben und mischen.

Nach dem Mischen wird durch zwei Schleicher- Schüll - Schwarzband- Filter filtriert. Die Lösung muß völlig klar sein.

Die fixierten und abgespülten Blutaussstriche werden 2 Stunden bei 0 - 4° C inkubiert.

Anschließend erfolgt gründliche Spülung unter fließendem Leitungswasser und Lufttrocknung.

Die lufttrockenen Ausstriche werden 8 Minuten mit Mayer's Hämalaun gegengefärbt und anschließend einer 20-minütigen Spülung unter fließendem Leitungswasser unterzogen.

Die fertigen, lufttrockenen Präparate werden unter Ölimersion betrachtet.

Ausgezählt werden 100 segmentkernige neutrophile Granulozyten.

Die Beurteilung erfolgt nach dem Scoring-System (MERKER).

Klasse 0 - Zelle völlig frei von braunem Niederschlag

Klasse 1 - vereinzelt braune Granula

Klasse 2 - fortschreitende Granulation

Klasse 3 - reichliche Granulation

Klasse 4 - Zytoplasma voll Granula, Kerne nicht überlagert

Klasse 5 - Gesamte Zelle voll Granula, Kerne überlagert.

Indexberechnung

Multiplikation der gefundenen Leukozyten einer jeden Klasse mit ihrer Klassenzahl und Addition der Zahlen für sämtliche Klassen.

4.3 Vaginalabstriche

Die Beurteilung der nach PAPENHEIM gefärbten Vaginalabstriche erfolgt nach den von SCHMIDT (32) für die Ratte gegebenen Richtlinien.

5.0 Ergebnisse

Bei der normalen Ratte finden sich äußerst selten neutrophile Granulozyten, die im mikroskopischen Präparat keine Enzymaktivität aufweisen. Auch die Klassen 1 und 2 sind selten vertreten.

Neutrophile Granulozyten der Klassen 3 bis 5 machen den Hauptanteil der Neutrophilen aus, wobei Klasse 4 in der Regel überwiegt.

Innerhalb der Leukozytenverteilung der Klassen 3 bis 5 wird die Variation der ALP- Indexhöhe manifest.

5.1 Versuche an normalen Ratten

5.11 Normale männliche Ratten

Von fünf männlichen Ratten wurden acht Tage lang in 24-stündigen Abständen Blutausstriche angefertigt und der ALP- Index bestimmt.

Der individuelle Mittelwert $\bar{x}_i$ einer jeden Ratte wurde berechnet. Es sind individuelle Unterschiede in der Indexhöhe vorhanden. Die Standardabweichungen vom individuellen Mittelwert $\bar{x}_i$ bei der männlichen Ratte betragen zwischen 3,46 und 14,42. Die Indexmittelwerte der Gruppe bewegen sich zwischen 366 und 383 (Tabelle I).

5.12 Normale weibliche Ratten

Von sieben weiblichen Ratten wurden in 24- stündigen Abständen Blutausstriche angefertigt und der ALP- Index bestimmt. Gleichzeitig wurde durch mikroskopische Zelldifferenzierung des nach PAPPENHEIM gefärbten Vaginalabstrichs die jeweilige Zyklusphase festgestellt.

Die individuellen Mittelwerte weiblicher Ratten liegen höher als bei der männlichen Ratte. Die ALP- Indices unterliegen stärkeren Schwankungen (Tabelle II).

Setzt man den ALP- Index in Beziehung zur Zyklusphase, so ergeben sich folgende Mittelwerte:

Zyklusphase	$\bar{x}$	s
Proöstrus (1)	429	7,28
früher Östrus (2)	441	18,76
Östrus (3)	436	12,93
Östrusende (4)	430	16,37
Metöstrus (5)	403	19,49
Ende Met- Anfang Diöstrus (6)	406	11,25
Diöstrus (7)	418	12,24
Di- bis Pro- östrus (8)	422	
=====		

Für die Berechnung der Mittelwerte wurden nur die eindeutigen Scheidenbilder genutzt, so daß die Werte des 2. - 8. Versuchstages bei Ratte 6 für die Bewertung ausfielen.

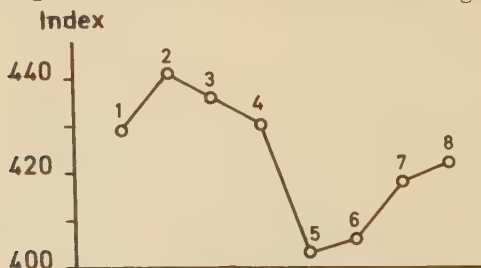
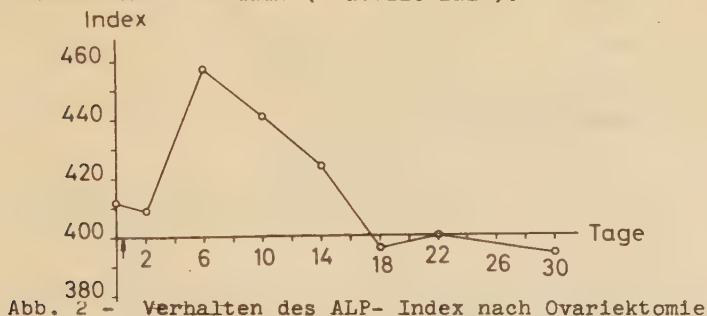


Abb. 1 - Zyklusabhängigkeit des ALP- Index bei der normalen weiblichen Ratte.

Der Index liegt während Proöstrus, Östrus und Östrusende deutlich höher als während Met- und Diöstrus. Der maximale ALP-Indexwert liegt im frühen Östrus. Vom Östrusende fällt der Index bis zu einem Minimum- Wert während des Metöstrus, um dann während Diöstrus und zum Proöstrus hin wieder anzusteigen.

5.13 Ovariectomierte Ratten

Der Index wurde etwa 2 Stunden vor Ovariectomie bestimmt. Dann wurde der Index 2, 6, 10, 14, 18, 22 und 30 Tage nach der Ovariectomie bestimmt (Tabelle III).



Der Index fällt zum zweiten Tag nach der Ovariectomie leicht ab, steigt dann zu einem Maximum um den 6. Tag nach der Ovariectomie an, um etwa am 16. Tag nach Ovariectomie den Ausgangswert wieder zu erreichen. Vom 18. Tag nach der Ovariectomie an liegt er unter dem Ausgangswert. Seine Höhe entspricht in etwa dem der männlichen Ratte. Zyklische Schwankungen sind bei der ovariectomierten Ratte nicht mehr nachweisbar.

5.14 Corticosteron

Es wurden acht männliche Ratten in den Versuch genommen. Jeweils vier Ratten erhielten am 1. und 2. Versuchstag in 24- stündigem Abstand je 0,5 mg Corticosteron i.m.. Blutausstriche wurden zu Versuchsbeginn und täglich in 24- stündigen Abständen bis zum 5. Tag nach Versuchsbeginn genommen (Tabelle IV).

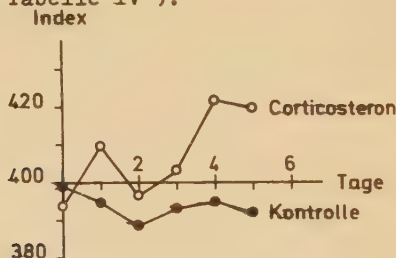


Abb. 3 - Verhalten des ALP- Index auf Corticosteron

Der Index ist 24 Stunden nach der ersten Injektion erhöht, fällt 48 Stunden nach der ersten und 24 Stunden nach der zweiten Injektion wieder ab, um dann ein Maximum 96 Stunden nach der ersten Injektion zu erreichen.

5.15 Oestradiolbenzoat, Progesteron

Der Versuch wurde sowohl an weiblichen Kastraten als auch an männlichen Tieren durchgeführt. Jede Versuchsgruppe bestand aus 16 Tieren, aus denen zwei Untergruppen gebildet wurden.

Gruppe I - je zwei Tiere - kein Oestradiolbenzoat

- am 3. und 4. Versuchstag je
1 mg (2 mg) Progesteron
- zwei Tiere - am 1. und 2. Versuchstag je 0,5 µg
Oestradiolbenzoat
 - am 3. und 4. Versuchstag je
1 mg (2 mg) Progesteron
- zwei Tiere - am 1. und 2. Versuchstag je 1 µg
Oestradiolbenzoat
 - am 3. und 4. Versuchstag je
1mg (2 mg) Progesteron
- zwei Tiere - am 1. und 2. Versuchstag je 2 µg
Oestradiolbenzoat
 - am 3. und 4. Versuchstag je 1 mg
(2 mg) Progesteron

Gruppe II - je zwei Tiere- kein Progesteron

- am 3. und 4. Versuchstag je 2 µg
Oestradiolbenzoat
- zwei Tiere- am 1. und 2. Versuchstag je 0,25
(1 mg) Progesteron
 - am 3. und 4. Versuchstag je 2 µg
Oestradiolbenzoat
- zwei Tiere - am 1. und 2. Versuchstag je 0,5
(2) mg Progesteron
 - am 3. und 4. Versuchstag je 2 µg
Oestradiolbenzoat
- zwei Tiere - am 1. und 2. Versuchstag je 1 mg
(4 mg) Progesteron
 - am 3. und 4. Versuchstag je 2 µg
Oestradiolbenzoat

Der ALP- Index wurde bestimmt:

- 1) vor Hormonbehandlung, zu Beginn des Versuches
 - 2) am 3. Versuchstag, 48 Stunden nach Beginn des Versuches
 - 3) am 5. Versuchstag, 96 Stunden nach Versuchsbeginn und 24 Stunden nach der letzten Hormonapplikation.
- (Index- Werte siehe Tabelle V, VI)

Progesteron

Auf Progesteron in ganz geringen Dosen (0,25 und 0,5 mg) findet ein leichter Abfall des ALP- Index statt.

Dosen von 1, 2 und 4 mg vermögen den Index konstant zu halten.

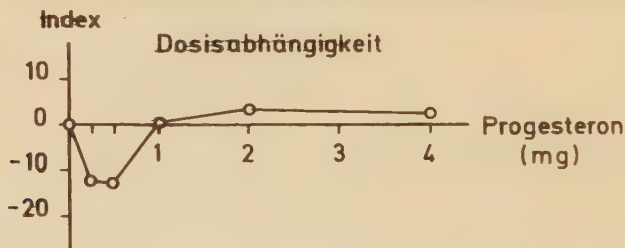
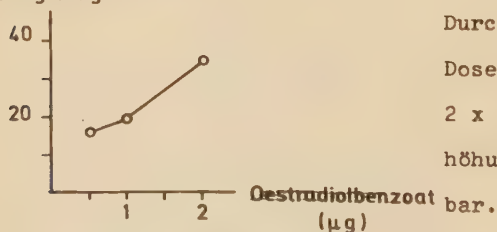


Abb. 4- Verhalten des ALP- Index auf Progesteron in Abhängigkeit von der Dosis

Oestradiolbenzoat

Steigerung



Durch Oestradiolbenzoat in Dosen von 2 x 0,5, 2 x 1 und 2 x 2 µg ist eine starke Erhöhung des ALP- Index erzielbar.

Abb. 5 - Dosisabhängigkeit der Wirkung von Oestradiolbenzoat

Oestradiolbenzoat nach Progesteronvorbehandlung

Nach Progesteronvorbehandlung wird eine stärkere Indexerhöhung als auf Oestradiolbenzoat allein festgestellt.

Dabei scheint eine Dosisabhängigkeit vom Progesteron nicht zu bestehen, während 2 μ g Oestradiolbenzoat bei jeder Versuchsgruppe einen etwa gleichen Indexanstieg bewirkt.

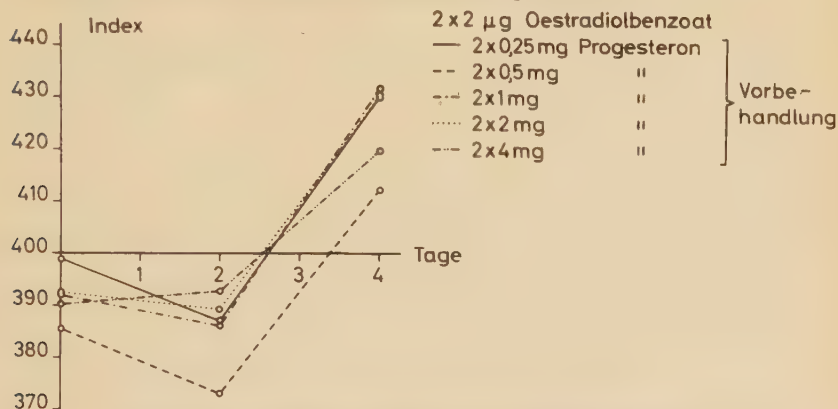


Abb. 6 - Verhalten des ALP- Index auf Oestradiolbenzoat nach Vorbehandlung mit Progesteron

Progesteron nach Oestradiolbehandlung

Wird Progesteron nach Oestradiolbenzoat gegeben, so lässt sich ebenfalls ein stärkerer Anstieg des Index als auf Oestradiolbenzoat allein erzielen. Dabei zeigt die Kombination von 2 x 1 μ g Oestradiolbenzoat und Progesteron den günstigsten Effekt. Zwischen der Wirkung von 1 mg Progesteron und 2 mg Progesteron besteht kein Unterschied.

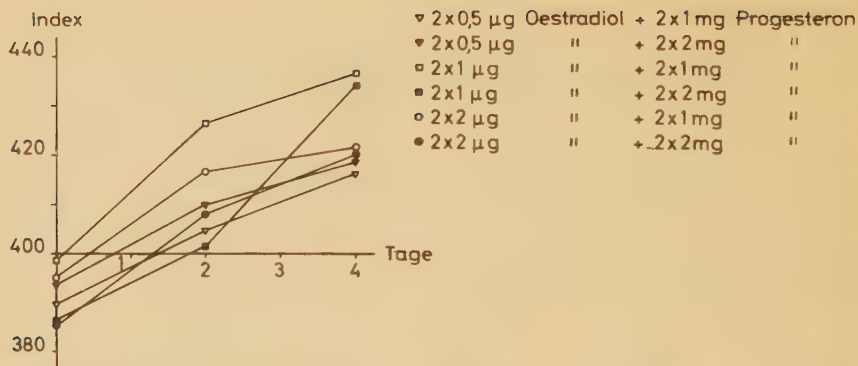


Abb. 7 - Verhalten des ALP- Index auf Progesteron nach Oestradiolvorbehandlung

5.16 Trijodthyronin

Es wurden neun Ratten mit Trijodthyronin behandelt. Die Versuchstiere erhielten am 1., 2., und 3. Versuchstag je 20 µg Trijodthyronin intramuskulär injiziert. Am 4. Versuchstag wurde keine Injektion vorgenommen. Am 5. und 6. Versuchstag wurde den Tieren je 100 µg T3 intramuskulär injiziert.

Blutausstriche wurden zu Versuchsbeginn, dann täglich vor der Injektion und bis zum 9. Versuchstag täglich in 24- stündigen Abständen angefertigt. (Tabelle VII)

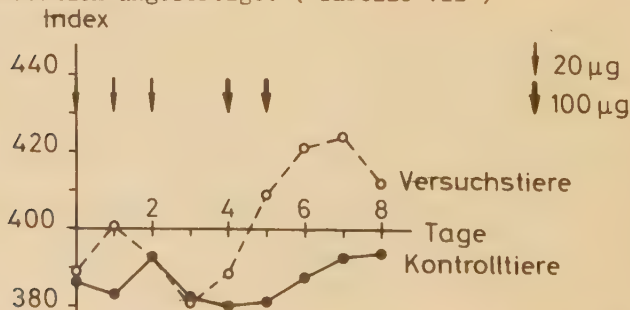


Abb. 8 - Verhalten des ALP- Index auf T3 - normale Ratten

Auf Injektion von 20 μg T₃ pro Tag drei Tage lang hintereinander steigt der ALP- Index am Tag nach der ersten Injektion leicht an, fällt dann aber nach der zweiten und dritten Injektion wieder ab. Auf zweimalige Injektion von 100 μg Trijodthyronin steigt der ALP- Index stark an. Das Maximum liegt 72 Stunden nach der ersten und 48 Stunden nach der zweiten Injektion.

5.17 Thyreotropin

Zehn Ratten wurden 5 Tage lang mit 20 MSE TSH täglich subcutan behandelt. (Tabelle VIII zeigt die ALP- Indices dieser Ratten)

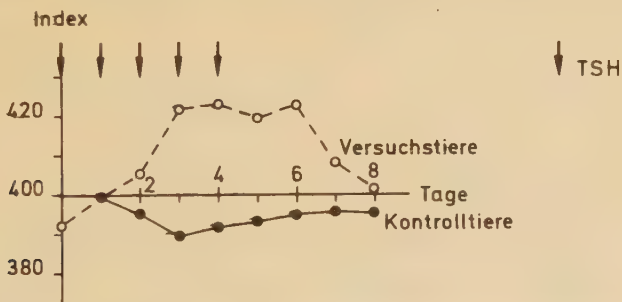


Abb. 9 - Verhalten des ALP- Index auf Thyreotropin - normale Ratten

Der ALP- Index steigt auf TSH stark an. Das Maximum wird bereits nach der dritten Injektion erreicht und bis zwei Tage nach der letzten Injektion gehalten. Am dritten Tag nach der letzten Injektion ist der Index bereits deutlich gefallen und sinkt weiter.

5.18 Thyreotropin und Oestradiolbenzoat

Es wurden vier Gruppen von je sechs Tieren in den Versuch genommen. Die erste Gruppe als Kontrolltiere wurde nicht behandelt. Die Tiere der Gruppe II erhielten 5 Tage hintereinander je 20 MSE TSH subcutan injiziert. Den Tieren der dritten Gruppe wurde an zwei aufeinander folgenden Tagen je 0,5 μ g Oestradiolbenzoat injiziert. Die Tiere der Gruppe IV erhielten am 1. und 2. Versuchstag je 0,5 μ g Oestradiolbenzoat und 4 MSE TSH, am 3., 4. und 5. Versuchstag je 4 MSE TSH.

Blutausstriche wurden zu Versuchsbeginn und täglich in 24- stündigen Abständen angefertigt. (Tabelle IX)

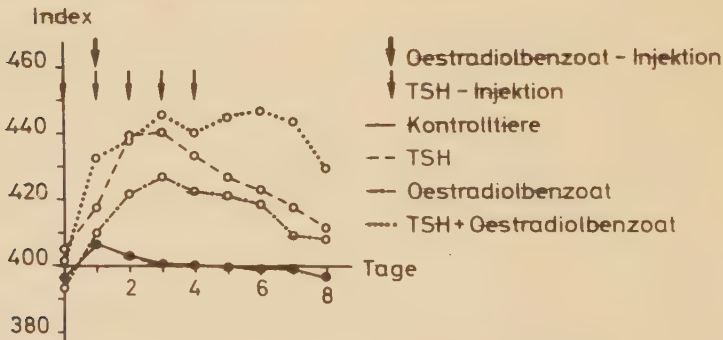


Abb. 10 - Verhalten des ALP- Index auf TSH, Oestradiolbenzoat und Kombination beider - normale Ratten

Der ALP- Index steigt in den verwendeten Dosen auf TSH stärker als auf Oestradiolbenzoat, fällt aber schneller wieder ab. Die Kombination von TSH mit Oestradiolbenzoat vermag den ALP- Index noch stärker zu erhöhen. Die Indexerhöhung auf TSH wird durch Oestradiolbenzoat verlängert.

5.2 Versuche an Vitamin E Mangel - Ratten

5.21 Index

In der Höhe des ALP- Index bestehen keine signifikanten Unterschiede zu normalen Ratten. (Tabelle XXI - Kontrolltiere)
Der Index liegt jedoch an der unteren Grenze des Normalbereiches.

5.22 Oestradiolbenzoat

Es wurden acht männliche Vitamin E Mangel- Ratten in den Versuch genommen. Fünf Tiere befanden sich zum Zeitpunkt des Versuches seit 4 1/2 Monaten im Vitamin E Mangel (Gruppe I). Drei Tiere befanden sich seit knapp 4 Monaten im Vitamin E Mangel (Gruppe II).

Aus jeder Gruppe blieb je ein Tier unbehandelt. Die übrigen Ratten erhielten am 1. und 2. Versuchstag je 0,05 µg Oestradiolbenzoat intramuskulär injiziert. Am 3. Versuchstag wurde keine Injektion vorgenommen. Am 4. und 5. Versuchstag wurde den Tieren je 2 µg Oestradiolbenzoat injiziert. Blutaussstriche wurden zu Versuchsbeginn, vor jeder Injektion und täglich in 24- stündigen Abständen angefertigt.

(Tabelle X)

Die sich im Vitamin E Mangel befindenden Tiere zeigen einen schwachen Anstieg des ALP- Index, der sich jedoch im normalen Indexbereich hält. Der Anstieg tritt gegenüber der Reaktion der Normalratten verzögert auf.

Bei Gruppe I fällt der Anstieg in den 2. Tag nach der letzten Oestradiolbenzoatinjektion und dauert einen Tag.

Bei Gruppe II ist das Maximum am Tag nach der letzten Injektion erreicht; die Indexerhöhung hält am nachfolgenden Tag an.

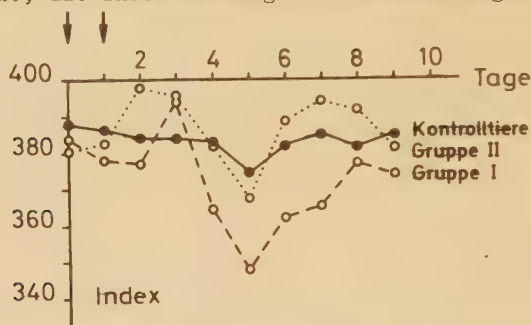


Abb. 11 - Verhalten des ALP- Index auf Oestradiolbenzoat - Vitamin E Mangel Ratten

Am 3. Tag nach der letzten Injektion ist der Index stark gefallen und zwar bei Gruppe I stärker als bei Gruppe II.

Der ALP- Index erreicht das bei Gruppe I im subnormalen Bereich liegende Minimum am 4. Tag nach der letzten Injektion, steigt dann wieder an, um am 8. Tag nach der letzten Injektion den Ausgangswert zu erreichen. Gruppe II zeigt dabei eine leicht überschießende Reaktion.

5.23 Trijodthyronin

Zehn Vitamin E Mangel- Ratten erhielten am 1., 2. und 3. Versuchstag je 20 µg Trijodthyronin intramuskulär injiziert.

Am 4. Versuchstag wurde keine Injektion vorgenommen.

Am 5. und 6. Versuchstag wurde den Tieren je 100 μ g Trijod-thyronin intramuskulär injiziert.

Blutausstriche wurden zu Versuchsbeginn, dann täglich vor der Injektion und bis zum 9. Versuchstag täglich in 24- stündigen Abständen angefertigt. (Tabelle XI)

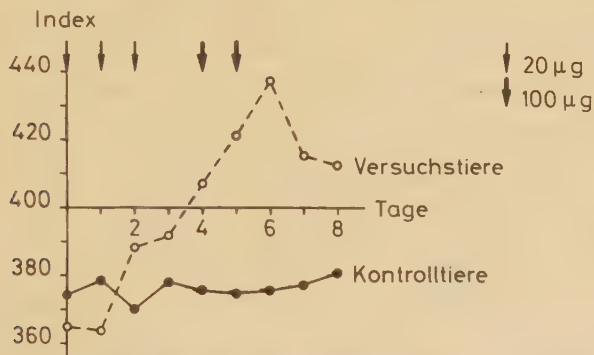


Abb. 12 - Verhalten des ALP- Index auf T₃- Vitamin E Mangel

Der ALP- Index beginnt im Gegensatz zur Reaktion der normalen Ratten nach der zweiten Injektion bereits stark zu steigen, steigt nach der dritten Injektion von 20 μ g T₃ und auch nach dem behandlungsfreien 4. Versuchstag weiter an.

Vom 4. Versuchstag steigt der Index linear bis zum Tag nach der zweiten Injektion von 100 μ g T₃ an, wo er auch sein Maximum erreicht. Am zweiten und dritten Tag nach der letzten Injektion ist der Index bereits wieder deutlich gefallen.

5.3 Versuche an PTU- vorbehandelten Ratten

5.31 Verhalten des ALP- Index auf PTU und Behandlung der unter PTU stehenden Ratten mit Oestradiolbenzoat

Zehn Ratten erhielten vom 1. bis zum 13. Versuchstag täglich 10 mg Propylthiouracil in wässriger Aufschwemmung peroral. Am 14. Versuchstag wurde mit der Behandlung ausgesetzt. Vom 15. bis zum 19. Versuchstag wurden täglich 3 mg PTU und vom 20. Versuchstag bis zu Versuchsende 1 mg PTU verabfolgt. Am 22. und 23. Versuchstag wurde acht von den unter PTU- Behandlung stehenden Ratten je 0,5 µg Oestradiolbenzoat injiziert. Die nicht mit PTU vorbehandelten zwei Kontrolltiere erhielten ebenfalls 0,5 µg Oestradiolbenzoat. Blutausstriche wurden zu Versuchsbeginn und täglich bis auf den 9., 11., 12., und 16. Versuchstag angefertigt. (Index- Werte in Tabelle XII)

1) PTU in Dosen von 10 mg / Tag:

Bei der Untersuchung der Blutausstrichpräparate wird eine stark ausgeprägte Neutropenie festgestellt. Eine Zählung der weißen Blutkörperchen wird nicht durchgeführt. Die Neutrophilen sind stark positiv. Der Index ist erhöht.

Eine einmalige Dosis von 10 mg PTU vermag den Index stark in die Höhe zu treiben. Er sinkt dann zu einem im subnormalen Bereich liegenden Minimum am 5. Tag nach der peroralen Verabfolgung und erreicht den Ausgangswert am 6. Tag nach der Verfütterung.

2) PTU in Dosen von 3 mg / Tag:

Auch in Dosen von 3 mg PTU pro Tag besteht eine Neutropenie. PTU in Dosen von 3 mg / Tag im Anschluß an eine Behandlung mit 10 mg / Tag vermag den Index ebenfalls zu erhöhen.

Im Gegensatz zur Dosis von 10mg / Tag wird ein Abfall auf subnormale Werte am 4. Tag der Behandlung beobachtet. Zum 5. Behandlungstag steigt der Index wieder an.

3) PTU in Dosen von 1 mg / Tag:

Bei der Behandlung mit 1 mg PTU pro Tag läßt die Neutropenie nach. Auf PTU in der Dosis von 1 mg / Tag im Anschluß an eine Behandlung mit zunächst 10 mg und dann 3 mg täglich sinkt der Index am Tag nach der ersten Verabfolgung auf leicht erniedrigte Werte und wird während der weiteren Behandlung auf dieser Höhe gehalten.

4) Oestradiolbenzoat mit 1 mg PTU / Tag:

Oestradiolbenzoat ruft bei PTU- vorbehandelten Ratten eine starke Erhöhung des ALP- Index hervor. Dieser Anstieg ist um einiges geringer als die durch PTU in Dosen von 10 bzw. 3 mg erzielbare Indexerhöhung.

Das Indexmaximum wird am Tag nach der ersten Injektion von Oestradiolbenzoat erreicht. Der Index fällt sofort wieder. Bei den nicht mit PTU vorbehandelten Ratten steigt der Index kontinuierlich bis zum zweiten Tag nach der letzten

Oestradiolbenzoatinjektion, um dann erst abzusinken.

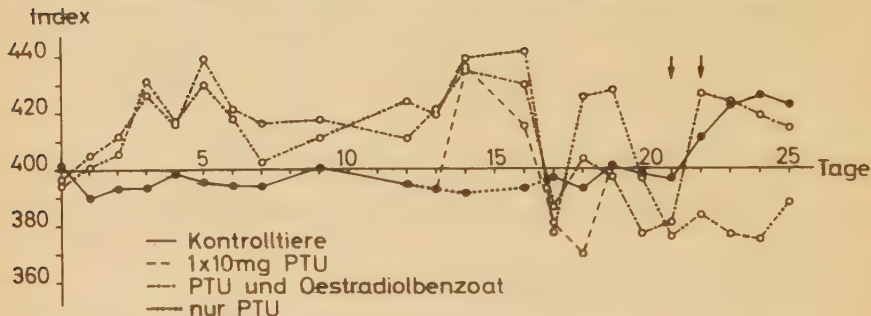


Abb. 13 - Verhalten des ALP- Index auf PTU und Wirkung von Oestradiolbenzoat auf den Index der PTU- vorbehandelten Ratte.

5.4 Versuche an hypophysektomierten Ratten

5.41 Verhalten des ALP- Index nach der Hypophysektomie

Der ALP- Index ist am Tag nach der Hypophysektomie sehr stark erhöht, steigt weiter bis zu einem Maximumwert in der ersten Woche nach der Hypophysektomie und sinkt langsam ab. (Tabelle XIII)

Er bleibt gegenüber dem Ausgangswert beträchtlich erhöht, jedoch in engen Grenzen konstant. (Tabelle XIV - Kontrolltiere)

5.42 Verhalten des ALP- Index auf TSH, Oestradiolbenzoat und Kombination von TSH mit Oestradiolbenzoat

Für den Versuch wurden sechszehn hypophysektomierte Tiere genommen.

Die vier Tiere der Gruppe I blieben als Kontrolltiere unbehandelt. Die vier Tiere der Gruppe II erhielten am 1. und 2. Versuchstag je 2 μ g Oestradiolbenzoat intramuskulär injiziert. Die Tiere der Gruppe III wurden mit je 5 x 20 MSE TSH subcutan behandelt. Die Ratten der Gruppe IV erhielten am 1. und 2. Versuchstag je 2 μ g Oestradiolbenzoat und je 4 MSE TSH subcutan; am 3., 4. und 5. Versuchstag erhielten die Tiere 4 MSE TSH.

Blutausstriche wurden zu Versuchsbeginn, täglich vor der Injektion und bis zum Versuchsende täglich angefertigt.

(Tabelle XIV)

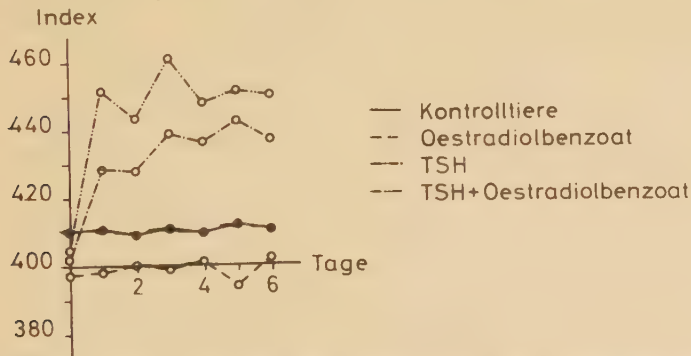


Abb. 14 - Verhalten des ALP- Index auf TSH, Oestradiolbenzoat und Kombination beider - hypophysektomierte Ratten

Mit Oestradiolbenzoat allein ist keine Beeinflussung des ALP- index bei der hypophysektomierten Ratte zu erzielen.

TSH in der Dosis von 5 x 20 MSE bewirkt eine ausgeprägte Indexerhöhung.

Diese Indexerhöhung läßt sich durch Kombination von TSH in der Dosis von 5 x 4 MSE mit 2 x 2 µg Oestradiolbenzoat noch übertreffen.

Der Kurvenverlauf entspricht dabei in etwa dem von TSH allein.

Tabelle I
(ALP-Indices normaler männlicher Ratten über 8 Tage)

1	389	384	386	386	392	382	390	391	$\bar{x}_I$	s_I
2	393	387	393	390	383	378	395	395	387,5	3,55
3	371	351	355	364	372	383	382	379	369,62	12,07
4	321	326	351	333	338	358	357	352	342	14,42
5	388	384	383	390	394	387	389	389	388	3,46
$\bar{x}$	372,4	366,4	373,6	372,6	375,8	377,6	382,6	381,2		
s	29,95	26,99	19,20	20,83	22,85	11,41	11,10	17,36		

Tabelle II
(Indices normaler weiblicher Ratten über 8 Tage-Vergleich mit der Zyklusphase)

Ratte										$\bar{x}$	s1
1 Zyklusphase											
Index	(2)	(3)	(6)	(1)	(2)	(3)	(5)	(8)			
	452	439	396	426	440	440	425	430	431	16,71	
2 Zyklusphase											
Index	(2)	(3)	(5)	(1)	(3)	(4)	(7)	(1)			
	464	440	406	428	461	448	397	423	433,37	25,69	
3 Zyklusphase											
Index	(7)	(2)	(3)	(5)	(7)	(7)	(1)	(3)			
	415	415	435	384	415	421	422	414	415,12	14,20	
4 Zyklusphase											
Index	(6)	(8)	(3)	(4)	(6)	(1)	(3)	(3)			
	412	422	433	426	418	439	460	435	430,62	14,83	
5 Zyklusphase											
Index	(7)	(3)	(4)	(6)	(2)	(3)	(5)	(7)			
	408	442	416	403	432	424	371	408	413	21,53	
6 Zyklusphase (3) Indifferente Stadien, die sich zwischen Met- und Diöstrus bewegen mit massenhaft Leukozyten											
Index	425	408	414	423	433	437	420	401	420,12	12,23	
7 Zyklusphase											
Index	(5)	(7)	(3)	(3)	(5)	(7)	(5)	(7)			
	416	438	433	423	422	424	390	428	421,75	14,64	
$\bar{x}$	427,42	429,14	419	416,14	431,57	433,28	412,14	419,86			
s	21,79	13,89	15,17	16,51	16,78	10,26	28,94	12,65			
(1) = Proöstrus (2) = früher Östrus (3) = Östrus (4) = Östrusende											
(5) = Metöstrus (6) = Ende Met-Anfang Diöstrus (7) = Diöstrus (8) = Di- bis Proöstrus											

(1) = Proöstrus (2) = früher Östrus (3) = Östrus (4) = Östnusende
 (5) = Metöstrus (6) = Ende Met-Anfang Diöstrus (7) = Diöstrus (8) = Di- bis Proöstrus

Tabelle*III

(ALP-Indices ovariectomierter Ratten)

Ratte	2 Stdn. v.		Index					
	Ovariectomie	2	Tage nach Ovariectomie					
		2	6	10	14	18	22	30
1	397	391	431	420	387	381	396	398
2	414	413	422	374	432	414	405	395
3	417	411	399	480	491	424	491	407
4	417	395	464	472	411	382	366	389
5	412	388	427	382	385	367	393	397
6	427	416	440	435	411	368	393	384
7	412	400	466	477	433	405	408	393
8	381	407	476	481	421	430	393	401
9	423	407	497	356	436	408	398	390
10	410	392	479	438	463	411	402	407
11	405	408	484	461	404	390	391	384
12	421	429	493	462	437	404	408	407
13	408	432	494	476	431	395	362	370
14	426	428	417	445	403	380	390	387
15	396	410	467	402	400	378	397	391
16	421	418	461	493	431	402	411	401
$\bar{x}$	411,93	409,06	457,31	440,87	423,50	396,18	400,25	393,81
s	12,36	13,62	30,37	39,44	26,57	17,38	27,70	11,29
=====								

Tabelle IV

(Verhalten des ALP-Index auf Corticosteron)

Kontrollen						2 x 0,5 mg Corticosteron					
1	2	3	4	$\bar{x}$	s	1	2	3	4	$\bar{x}$	s
398	397	399	402	399	3,74	394	385	399	397	393,75	6,18
390	398	392	399	394,75	4,43	415	396	400	427	409,5	14,25
375	391	391	397	388,5	9,36	396	390	386	413	396,25	10,61
399	393	387	393	393	8,49	396	403	395	418	403	7,59
397	398	392	392	394,75	3,20	424	417	414	431	421,5	4,03
395	389	388	396	392	4,08	422	415	418	424	419,75	4,03
=====											

Tabelle V

(Verhalten des ALP-Index auf Oestradiolbenzoat und Progesteron - normale Ratten)

Dosis	Kastraten				s		Dosis	Männchen				s	
	1	2	$\bar{x}$					1	2	3	4	$\bar{x}$	
-	398	397	397,5		7,07		-	394	394	389	385	390,5	4,36
-	372	373	372,5		7,07		-	383	358	364	377	370,5	11,50
2 x 1 mg Progesteron	386	399	392,5		9,19		2 x 2 mg Progesteron	386	394	381	365	381,5	12,23
-	395	384	389,5		7,78		-	397	383	397	397	393,5	7,00
2 x 0,5 µg Oestradiol	417	392	404,5		17,68		2 x 0,5 µg Oestradiol	439	374	421	405	409,75	28,02
2 x 1 mg Progesteron	413	419	416		4,24		2 x 2 mg Progesteron	436	409	410	419	418,5	12,50
-	407	390	398,5		12,02		-	379	387	386	393	386,25	5,74
2 x 1 µg Oestradiol	436	417	426,5		13,44		2 x 1 µg Oestradiol	369	399	407	430	401,25	25,20
2 x 1 mg Progesteron	443	430	436,5		9,19		2 x 2 mg Progesteron	430	439	411	455	433,75	18,36
-	389	401	395		8,49		-	357	396	392	396	385,25	18,93
2 x 2 µg Oestradiol	408	425	416,5		12,06		2 x 2 µg Oestradiol	371	438	412	410	408,85	27,65
2 x 1 mg Progesteron	421	422	421,5		7,07		2 x 2 mg Progesteron	423	443	445	399	420	18,29

Fortsetzung von Tabelle V

Dosis	Kastraten			Dosis	Männchen			Kastraten		
	1	2	$\bar{x}$		1	2	$\bar{x}$	1	2	3
-	393	407	400	-	385	364	375	385	364	402
-	393	374	383,5	-	385	389	387	385	389	399
2 x 2µg Oestradiol	416	436	426	2 x 2µg Oestradiol	417	424	421	421	422	422
=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
-	407	391	399	-	400	391	395	399	392	395
2 x 0,25mg Progesteron	372	402	387	2 x 1mg Progesteron	397	387	392	415	378	394
2 x 2µg Oestradiol	436	424	430	2 x 2µg Oestradiol	439	419	429	438	405	425
=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
-	384	387	385,5	-	396	393	394	387	392,5	3,87
2 x 0,5mg Progesteron	384	362	373	2 x 2mg Progesteron	387	379	392	399	389,25	8,42
2 x 2µg Oestradiol	419	405	412	2 x 2µg Oestradiol	426	431	428	454	411	430,5
=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
-	370	401	385,5	-	389	384	392	396	390,25	5,06
2 x 1mg Progesteron	345	395	370	2 x 4mg Progesteron	394	381	387	400	396	392,75
2 x 2µg Oestradiol	424	464	444	2 x 2µg Oestradiol	414	415	414	414	436	419,75
=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====

(aufgeschlüsselte Ergebnisse aus Tabelle V)

Ostradiolbenzoat

99	99
98	98
97	97
96	96
95	95
94	94
93	93
92	92
91	91
90	90
89	89
88	88
87	87
86	86
85	85
84	84
83	83
82	82
81	81
80	80
79	79
78	78
77	77
76	76
75	75
74	74
73	73
72	72
71	71
70	70
69	69
68	68
67	67
66	66
65	65
64	64
63	63
62	62
61	61
60	60
59	59
58	58
57	57
56	56
55	55
54	54
53	53
52	52
51	51
50	50
49	49
48	48
47	47
46	46
45	45
44	44
43	43
42	42
41	41
40	40
39	39
38	38
37	37
36	36
35	35
34	34
33	33
32	32
31	31
30	30
29	29
28	28
27	27
26	26
25	25
24	24
23	23
22	22
21	21
20	20
19	19
18	18
17	17
16	16
15	15
14	14
13	13
12	12
11	11
10	10
9	9
8	8
7	7
6	6
5	5
4	4
3	3
2	2
1	1

Fortsetzung von Tabelle VI

Progesteron und Oestradiolbenzoat					
2 x 0,25 mg Progesteron +	407	391			Σ 11,31
2 x 2 µg Oestradiol	372	402			21,21
	436	424			430 8,49
2 x 0,5 mg Progesteron +	384	387			385,5 2,12
2 x 2 µg Oestradiol	384	362			373 15,56
	419	405			412 9,90
2 x 1 mg Progesteron +	400	391	399	392	392,16 11,65
2 x 2 µg Oestradiol	397	387	415	378	386,16 23,62
	439	419	438	405	431,5 20,41
2 x 2 mg Progesteron +	396	393	394	387	392,5 3,87
2 x 2 µg Oestradiol	387	379	392	399	389,25 8,42
	426	431	454	411	430,5 13,94
2 x 4 mg Progesteron +	389	384	392	396	390,25 5,06
2 x 2 µg Oestradiol	394	381	400	396	392,75 8,22
	414	415	414	436	419,75 10,84

Fortsetzung von Tabelle VI

Oestradiolbenzoat und Progesteron

	Index				$\bar{x}$		s	
2 x 0,5 μ g Oestradiol + 2 x 1 mg Progesteron	395	384	417	392	389,5	7,78	404,5	17,62
	413	419			416	4,24		
2 x 0,5 μ g Oestradiol + 2 x 2 mg Progesteron	397	383	397	397	393,5	7,00	409,75	29,25
	439	374	421	405	418,5	12,50		
	436	409	410	419				
2 x 1 μ g Oestradiol + 2 x 1 mg Progesteron	407	390			398,5	12,02	426,5	13,44
	436	417			436,5	9,19		
	443	430						
2 x 1 μ g Oestradiol + 2 x 2 mg Progesteron	379	387	386	393	386,25	5,72	401,25	25,20
	369	399	407	430	433,75	18,36		
	430	439	411	455				
2 x 2 μ g Oestradiol + 2 x 1 mg Progesteron	389	401			395	8,49	416,5	12,02
	408	425			421,5	0,07		
	421	422						
2 x 2 μ g Oestradiol + 2 x 2 mg Progesteron	357	396	392	396	385,25	18,93	407,75	23,51
	371	438	412	410	420	18,29		
	423	443	415	399				

Tabelle VII

(Verhalten des ALP- Index auf T3 - normale Ratten)

Kontrolltiere					Versuchstiere										
1	2	3	$\bar{x}$	s	1	2	3	4	5	6	7	8	9	$\bar{x}$	s
372	390	396	386	12,49	392	367	372	342	396	390	394	406	391	383,33	19,59
357	397	395	383	22,54	419	348	382	368	398	403	428	442	417	400,55	30,13
381	397	400	392,6	10,21	413	369	328	390	406	393	408	409	417	392,55	28,36
376	370	401	382,3	16,74	403	383	340	333	405	385	401	390	385	380,55	26,36
359	385	396	380	19,0	401	373	395	375	382	382	396	395	400	388,77	10,81
366	380	398	381,3	16,57	409	403	405	385	413	408	417	424	412	408,44	10,84
378	387	398	387,6	10,02	429	407	401	400	423	413	437	443	436	421	16,19
387	388	403	392,6	8,96	433	410	387	379	454	442	469	429	413	424	29,72
396	387	399	394	8,83	421	391	377	397	429	450	416	406	421	412	21,90
=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====

Tabelle VIII

(Verhalten des ALP- Index auf Thyreotropin - normale Ratten)

Kontrollen						Versuchstiere												
1	2	3	4	$\bar{x}$	s	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x}$	s	
-	-	-	-	-		389	396	387	394	387	384	401	393	396	396	392,3	5,33	
414	396	394	395	399,75	9,54	394	403	381	383	398	402	395	402	415	418	399,1	11,89	
404	395	395	386	395	12,73	388	420	404	411	364	387	426	409	436	409	405,4	21,05	
386	377	401	394	389,5	10,34	411	417	432	414	414	422	431	411	437	430	421,9	9,80	
390	399	390	388	391,75	4,92	422	432	415	425	424	425	425	408	434	422	423,2	7,84	
394	390	398	390	393	6,63	418	415	431	424	414	419	418	411	433	409	419,2	7,97	
400	390	398	392	395	8,25	428	422	439	406	402	417	430	417	445	421	422,7	13,42	
398	396	395	394	395,75	1,71	412	415	397	408	384	397	423	416	437	394	408,3	15,66	
399	390	395	398	395,5	4,04	422	385	391	397	396	382	401	409	419	410	401,2	13,61	

Tabelle IX

(Verhalten des ALP- Index auf Oestradiolbenzoat, TSH und Kombination beider - normale Ratten)

Gruppe I - Kontrolltiere										Gruppe II- 5 x 20 MSE TSH									
1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	s			1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$			s
391	397	391	401	412	387	396,5	9,07			394	410	405	404	409	408	405			5,87
399	405	410	412	410	395	405,16	6,85			420	426	431	406	412	411	417,66			9,65
404	406	399	400	411	398	403	4,98			434	462	429	446	433	434	439,66			12,34
397	406	401	404	403	393	400,66	4,84			425	450	430	459	446	434	440,66			13,08
398	405	397	397	404	400	400,16	3,54			420	447	419	450	429	434	433,16			13,17
399	402	396	401	402	399	399,83	3,28			415	427	416	438	420	444	426,66			12,03
396	403	396	408	400	393	399,33	5,50			412	417	419	435	429	426	423			8,51
398	406	398	397	397	398	399	3,46			414	423	410	429	412	419	417,83			7,25
393	405	391	400	402	388	396,5	6,77			423	420	414	400	405	408	411,66			8,91

Fortsetzung von Tabelle IX

<u>Gruppe III - 2 x 0,5 µg Oestradiolbenzoat</u>								<u>Gruppe IV - 2 x 0,5 µg Oestradiolbenzoat + 5 x 4 MSE TSH</u>							
1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	s	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	s
384	407	380	395	393	401	393,33	10,13	411	398	389	379	420	411	401,33	15,61
406	426	387	403	409	429	410	15,57	431	410	411	425	458	460	432,5	22,05
419	447	413	417	412	423	421,83	12,97	431	415	416	438	466	461	437,83	21,79
420	439	409	436	429	429	427	15,57	445	436	426	419	471	475	445,33	23,21
406	433	396	434	424	441	422,33	17,67	440	429	430	422	457	462	440	16,24
412	429	410	437	408	431	421,16	12,58	452	435	428	423	458	473	444,83	19,36
414	413	423	432	402	428	418,66	11,09	450	447	429	430	445	479	446,66	18,17
402	402	395	422	419	414	409	10,84	435	438	419	454	458	455	443,16	15,20
407	419	405	422	395	400	408	10,58	424	420	429	423	439	441	429,33	8,78

Tabelle X

(Verhalten des ALP- Index auf Oestradiolbenzoat - Vitamin E Mangel)

Kontrolltiere					Gruppe I					Gruppe II				
1	2	$\bar{x}$	s		1	2	3	4	$\bar{x}$	s	1	2	$\bar{x}$	s
387	389	388	1,41		398	377	376	384	383,75	10,14	385	376	380,5	6,36
373	400	386,5	19,09		395	373	377	368	378,25	11,29	391	374	382,5	12,02
379	389	384	7,07		393	378	367	371	377,25	11,44	397	399	398	1,41
377	391	384	9,90		409	383	373	411	394	20,09	399	393	396	4,24
369	397	383	19,54		385	336	359	378	364,5	23,63	385	379	382	4,24
365	384	374,5	13,44		384	334	325	350	348,25	25,98	381	354	367,5	19,09
376	388	382	8,49		366	350	338	395	362,25	24,66	396	381	388,5	10,60
374	396	385	12,73		377	355	369	362	365,75	9,43	409	380	394,5	20,51
376	387	381,5	7,78		378	378	369	384	377,25	6,18	406	378	392	19,80
388	382	385	4,24		373	380	364	379	374	7,35	385	378	381,5	4,95

Tabelle XI

(Verhalten des ALP- Index auf Trijodthyronin - Vitamin E Mangel)

Kontrolltiere						Versuchstiere												
1	2	3	4	$\bar{x}$	s	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x}$	s	
373	403	382	340	374,25	26,22	372	381	359	386	385	312	346	388	356	364	364,9	23,99	
357	399	395	355	378,5	23,85	312	296	364	406	408	333	350	400	394	366	363,8	41,12	
368	394	373	345	370	20,12	364	369	396	401	419	366	391	393	398	388	388,5	18,53	
379	396	385	344	378	22,58	357	410	363	375	458	392	369	412	404	379	391,9	30,33	
385	385	386	346	375,5	19,69	395	400	386	418	460	384	391	428	405	404	407,1	23,10	
386	367	383	363	374,75	11,44	464	416	399	419	475	412	406	427	415	380	421,3	28,55	
-	383	386	358	375,66	15,37	469	430	416	436	496	435	422	444	427	402	437,7	27,07	
393	359	391	366	377,25	17,29	437	410	386	408	485	428	393	425	406	375	415,3	31,15	
385	371	397	371	381	12,54	405	391	409	401	490	412	414	402	418	384	412,6	29,11	

Tabelle XII

(Verhalten des ALP- Index auf PTU; Oestradiolbenzoat an PTU- vorbehandelte Ratten)

Kontrolltiere				Versuchstiere													
1	2	$\bar{x}$	s	1	2	3	4	5	6	7	8	$\bar{x}$	s	1	2	$\bar{x}$	s
403	400	401,5	2,12	390	389	398	402	417	393	392	393	396,75	9,22	387	402	394,5	10,61
383	397	390	9,90	342	403	421	377	470	396	408	423	405	37,13	408	393	400,5	10,61
396	391	393,5	3,54	351	401	397	400	470	440	420	417	412	34,74	373	438	405,5	45,96
391	396	393,5	3,54	407	464	430	373	487	418	435	400	426,75	36,19	396	467	431,5	50,20
401	396	398,5	3,54	410	448	372	377	488	433	431	374	416,63	53,07	424	410	417	9,90
400	391	395,5	6,36	402	469	434	406	479	446	454	423	439,13	28,06	436	424	430	8,49
398	391	394,5	4,95	412	474	424	393	492	403	398	373	421,13	41,20	428	408	418	14,14
397	391	394	4,24	386	420	414	410	491	412	371	425	416,13	34,96	390	415	402,5	17,68
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
397	404	400,5	4,95	396	367	361	390	437	401	403	317	417,25	50,41	391	431	411	28,28
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
391	398	394,5	4,95	395	387	398	391	489	422	390	415	410,88	33,94	401	446	423,5	31,82
395	391 ⁶	393	2,83	369	451	409	445	464	414	402	411	420,63	30,90	424	414	419	7,07
391	436			428	474	445	469	496	356	402	408	434,75	45,68	432	445	438,5	9,19

Fortsetzung von Tabelle XII

Kontrolltiere				Versuchstiere													
1	2	$\bar{x}$	s	1	2	3	4	5	6	7	8	$\bar{x}$	s	1	2	$\bar{x}$	s
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
393	415			398	428	412	438	471	419	427	445	429,75	22,21	463	419	441	31,11
397	381			378	379	391	386	451	369	363	374	386,38	27,58	376	379	377,5	2,12
393	370			412	406	377	408	404	417	412	395	403,88	12,69	429	421	425	5,66
398	404	401	4,95	382	403	404	386	403	395	406	398	397,13	8,89	414	441	427,5	19,09
403	393	398	7,07	386	383	371	381	394	365	364	373	377,13	10,60	388	405	396,5	12,02
●403	390	396,5	9,19	●361	364	374	366	389	376	339	376	380,63	19,87	378	376	377	1,41
●437	384	410,5	37,48	●426	447	433	433	416	433	408	412	426	13,14	375	392	383,5	12,02
433	411	422	15,56	421	430	434	413	425	415	427	421	423,25	7,19	382	372	377	7,07
436	415	425,5	14,85	411	438	411	405	410	428	423	420	418,25	11,08	375	375	375	0
430	414	422	11,31	409	426	423	422	410	399	401	424	414,25	10,85	395	381	388	9,90

■ - Die Ratte erhielt aus Versehen 10 mg PTU

● - Oestradiolbenzoatinjektion

■ - Die Ratte erhielt aus Versehen 10 mg PTU ● - Oestradiolbenzoatinjektion

Tabelle XIII

(Verhalten des ALP- Index auf Hypophysektomie)

Tage nach Hypo= physektomie	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	s
vor Hypoph.	310	354	318	325	379	381	344,5	31,26
1	400	392	391	349	448	422	400,33	33,27
4	489	471	486	452	500	493	484,83	17,50
8	463	450	439	432	494	494	462	26,91
11	439	456	417	413	486	486	449,5	31,92
14	426	439	431	485	494	478	458,83	30,12
17	400	397	419	412	482	447	429,16	32,84
20	398	418	416	418	469	462	430,16	25,99
42	402	417	394	407	414	401	405,83	8,61
=====								

(Verhalten des ALP- Index auf Oestradiolbenzoat, TSH und Kombination beider - hypophysektomierte Ratten)

Tabelle XIV

Gruppe I - Kontrolltiere

1	2	3	4	$\bar{x}$	s
401	415	424	400	410	11,58
402	416	419	405	410,5	8,27
401	417	418	400	409	8,68
400	417	418	408	410,75	8,46
401	415	409	413	409,5	6,19
409	415	413	411	412	2,58
406	415	415	405	410,25	5,5
=====					

Gruppe II - 2 x 2 μ g Oestradiolbenzoat

1	2	3	4	$\bar{x}$	s
408	388	389	403	397	10,03
409	395	386	402	398	13,90
406	407	386	401	400	9,70
405	396	388	405	398,5	8,19
407	398	396	403	401	4,97
413	393	388	381	393,75	13,74
400	399	399	410	402	5,35
=====					

Fortsetzung von Tabelle XIV

Gruppe III - 5 x 20 MSE TSH

1	2	3	4	$\bar{x}$	s
398	407	397	404	401,5	4,80
423	430	422	438	428,25	7,41
408	438	430	435	427,75	13,57
435	435	441	445	439	4,90
433	437	437	438	436,25	2,22
448	432	437	453	442,5	10,12
451	446	409	442	437	19,03
=====	=====	=====	=====	=====	=====

Gruppe IV - 2 x 2 µg Oestradiol + 5 x 4 MSE TSH

1	2	3	4	$\bar{x}$	s
411	406	405	395	404,25	6,69
459	447	459	442	451,75	8,62
462	428	454	431	443,75	16,82
477	445	479	443	461	20,98
452	452	450	438	448	6,73
451	461	471	423	451,5	20,68
446	451	458	446	450,25	5,68
=====	=====	=====	=====	=====	=====

6.0 Diskussion

Nach allem, was bis heute über die alkalische Leukozytenphosphatase bekannt ist, steht fest, daß sie ein adaptatives Enzym des Funktionsstoffwechsels der neutrophilen Granulozyten ist.

Das Enzym ist einmal genetisch festgelegt, wobei wir den Ort der genetischen Regulation zumindest für den Menschen kennen, zum anderen ist es induzierbar.

Eine Enzyminduktion bei der normalen Ratte bewirken, ebenso wie beim Menschen und beim Kaninchen, Stoffe mit oestrogener Wirkung, was durch die eindeutige Zyklusabhängigkeit und durch Aktivitätssteigerung auf Gabe von Oestradiolbenzoat demonstriert werden konnte.

Progesteron allein vermag in keinem Fall einen Aktivitätsanstieg herbeizuführen; in kleinen Dosen von $2 \times 0,25$ und $2 \times 0,5$ mg tritt vielmehr eine leichte Aktivitätsdepression ein. Dosen von $2 \times 1 - 4$ mg halten den Aktivitätsindex konstant.

Diese Befunde stehen im Gegensatz zu den durch QUIGLEY et al. für die Frau und Mc COY et al. für das Kaninchen gefundenen erhöhten ALP- Aktivitäten auf Progesteron. Auch bei vorsichtiger Beurteilung darf man daraus wohl schließen, daß es tierartliche Unterschiede in der Beeinflussung der ALP- Aktivität gibt, die für jede Tierart abzuklären sind.

Progesteronapplikation vor oder nach der Injektion von Oestradiolbenzoat vermag die durch Oestradiolbenzoat hervorgerufene Aktivitätssteigerung zu intensivieren. Dabei ist belanglos, wieviel Progesteron gegeben wird. Die endgültige Aktivität ist allein von der Oestradioldosis abhängig, d.h. Progesteron wirkt synergistisch ohne selbst aktivitätssteigernd zu sein.

Sowohl auf TSH als auch auf Trijodthyronin erfolgt bei der normalen Ratte eine starke Aktivitätserhöhung. TSH wirkt bekanntlich in der Weise auf die Schilddrüse, daß es aus den Lysosomen ein proteolysierendes Enzym freisetzt, welches wiederum Thyroxin und Trijodthyronin vom Thyreoglobulin abspaltet. Der Mechanismus der Aktivitätssteigerung auf TSH und T₃ dürfte also wohl derselbe sein, d.h. eigentlich wirksame Substanz ist T₃.

Kombinationsversuche von TSH mit Oestradiolbenzoat bei der normalen Ratte ergeben synergistische Wirkungen beider Stoffe.

Versuche an hypophysektomierten Ratten zeigen, daß eine unmittelbare Abhängigkeit zwischen aktivitätssteigernder Wirkung von Oestradiolbenzoat und dem Funktionszustand der Schilddrüse besteht. Oestradiolbenzoat ist bei totaler Ausschaltung der Schilddrüse durch Hypophysektomie nicht mehr in der Lage, eine Aktivitätssteigerung der ALP zu bewirken. Ein direkter Einfluß von Oestradiolbenzoat auf die ALP-Aktivität bei der Ratte kann somit ausgeschlossen werden.

Wird bei der hypophysektomierten Ratte TSH substituiert, so tritt eine deutliche Aktivitätszunahme der ALP ein; zusätzliche Applikation von Oestradiolbenzoat vermag auch hier den Aktivitätsindex weiter zu steigern.

Diese Beobachtungen finden Analogie in einer Veröffentlichung von BOGUTH u. FRENZEL (46), die nach Erstellung eines Aktivitätsindex für die Schilddrüse in direkter Weise die Schilddrüsenaktivität bei normalen und hypophysektomierten Tieren bestimmten. Normale Ratten reagieren im Gegensatz zu hypophysektomierten Tieren auf Oestradiolbenzoat mit einem Anstieg des Aktivitätsindex. TSH wirkt in jedem Fall aktivitätssteigernd auf die Schilddrüse; zusätzliche Gabe von Oestradiolbenzoat bewirkt einen stärkeren Anstieg des Aktivitätsindex als TSH allein.

Vergleich der Wirkung von Oestradiolbenzoat auf den ALP- Index bei der normalen, bei der unter PTU- Behandlung stehenden und bei der sich im Vitamin E Mangel befindenden Ratte läßt erhebliche Unterschiede sichtbar werden:

- bei der normalen Ratte: starke, kontinuierlich ansteigende, über längere Zeit anhaltende und nur langsam abfallende Aktivitätssteigerung.
- bei der PTU- behandelten Ratte: sprunghafte, kurzzeitige starke Aktivitätserhöhung.

- bei der Vitamin E Mangel Ratte: ebenfalls nur kurzzeitige, sprunghafte, wenig ausgeprägte Aktivitätssteigerung über ein oder zwei Tage. Dauer und Größe der Aktivitätszunahme scheinen von der Dauer des Vitamin E Mangels abhängig zu sein.

Die von DEUTINGER- SKRUBE et al. (47) auf Grund ihrer eigenen Befunde (höheres relatives Schilddrüsengewicht und verminderter Jodgehalt bei gleicher Jodspeicherung in der Schilddrüse bei der weiblichen Ratte) in Verbindung mit Berichten über vermehrten Thyreotropingehalt des Blutes während des Oestrus bei der Ratte postulierte steigernde Einwirkung oestrogen wirkender Substanzen auf die TSH- und Schilddrüsenhormoninkretion kann zumindest für die Schilddrüsenwirkung bestätigt werden.

Der Verlauf der Aktivitätssteigerung sowohl bei der unter PTU-behandlung stehenden als auch im Vitamin E Mangel sich befindenden Tiere legt den Verdacht nahe, daß es sich bei dem Effekt um Entspeicherung von noch vorhandenem aktiven Schilddrüsenhormon handelt.

Propylthiouracil wirkt bekanntlich thyreostatisch auf die Schilddrüse, indem es als Peroxidasehemmer die Oxidation des aus dem Blut aufgenommenen Jodid zu elementarem Jod unterbricht, d.h. die Synthese aktiver jodierter Schilddrüsenhormone verhindert.

Vitamin E Mangel manifestiert sich an der Schilddrüse ebenfalls durch verminderte Thyroxin- bzw. Trijodthyronin - Inkretion.

In beiden Fällen kann durch Applikation von Oestradiolbenzoat eine wenn auch nur kurzzeitige Inkretion von Schilddrüsenhormon bewirkt werden.

Für den Wirkungsmechanismus von Oestradiolbenzoat im Zusammenhang mit der Schilddrüsenfunktion gibt es dann drei Möglichkeiten:

- 1) direkte entspeichernde Wirkung an der Schilddrüse. Sie kann durch den Hypophysektomieversuch ausgeschlossen werden.
- 2) indirekte entspeichernde Wirkung dadurch, daß es die Lysosomen für TSH empfindlicher macht.
- 3) Schilddrüsenhormonabspaltung vom Trägerprotein in der Peripherie, verstärkte Wirkung und verstärkter Verbrauch von Schilddrüsenhormonen.

Für die beiden letztgenannten Möglichkeiten spricht auch der Kurvenverlauf der Kombinationsversuche von TSH mit Oestradiolbenzoat sowohl bei normalen als auch hypophysektomierten Tieren.

Die periphere Wirkung von Oestradiol scheint im Zusammenhang mit dem erhöhten Thyreotropingehalt des Blutes während des Oestrus bei der Ratte wahrscheinlicher zu sein, da bei einer Entspeicherung von Schilddrüsenhormon aus der Schilddrüse über den Rückkopplungsmechanismus eine verminderte TSH- Inkretion erfolgen müßte.

Auch ein zweifacher Angriffspunkt von Oestradiol sowohl an der Schilddrüse über die TSH- Empfindlichkeit der Lysosomen als auch in der Peripherie einen erhöhten Schilddrüsenhormonverbrauch ist durchaus möglich.

Damit ist meines Erachtens klargelegt, daß Oestradiolbenzoat zumindest bei der Ratte seine aktivitätssteigernde Wirkung auf die ALP- Aktivität nur über eine intakte Schilddrüseninkretion erfolgen kann.

Es liegt also keine direkte und spezifische Beeinflussung der ALP- Aktivität durch weibliche Steroidhormone vor, sondern die Regulation der ALP- Aktivität erfolgt im Zusammenhang mit der Regulation des Gesamtstoffwechsels.

7.0 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war, zu untersuchen, ob weibliche Steroidhormone in direkter Weise regulierend auf die Aktivität der alkalischen Leukozytenphosphatase eingreifen, oder ob der regulierende Einfluß über den Allgemeinstoffwechsel erfolgt.

An Hand von Versuchen an normalen, ovariectomierten, Vitamin E Mangel, hypophysektomierten und unter PTU- Behandlung stehenden Wistarratten konnte gezeigt werden:

- 1) Progesteron wirkt allein verabreicht in keinem Fall aktivitätssteigernd. In Kombination mit Oestradiolbenzoat unterstützt und intensiviert es die Wirkung von Oestradiolbenzoat.
- 2) Oestradiolbenzoat bewirkt einen Aktivitätsanstieg der ALP, der jedoch abhängig vom Funktionszustand der Schilddrüse ist; d.h. Oestradiolbenzoat wirkt über den Allgemeinstoffwechsel regulierend auf die ALP- Aktivität ein.

Oestradiolbenzoat und Thyreotropin wirken an der Schilddrüse synergistisch.

Oestradiolbenzoat scheint einen verstärkten Abbau der Schilddrüsenhormone in der Peripherie zu bewirken und die Lysosomen der Schilddrüse für TSH empfindlicher zu machen.

Literaturverzeichnis

- 1) Ackerman, G.A. - Cytochemical changes in Lymph Nodes and
Bellios, N.C. Spleen of Rats after total Body X⁻ Radia-
Knouff, R.A. tion
Frajola, W.J. Blood 9, 795 - 803, 1954

- 2) Bauer- Sic, P. - Zur Zytochemie des Rindes. Normalbefunde
 und Beobachtungen an einigen Leukosepatien-
 ten.

 Zbl. Vet. Med., Reihe A, 10, Heft 5
 365 - 380, 1963

- 3) Bauer- Sic, P. - Zytochemie der neutrophilen Granulozyten.

 Zbl. Vet. Med., Reihe A, Bd. 12, Heft 4
 365 - 379, 1965

- 4) Bauer- Sic, P. - Signifikante Veränderungen des alkalischen
 Leukozytenphosphatase- Index während des
 menstruellen Zyklus.

 Acta Endocrinologica 52, 130 - 148, 1966

- 5) Beal, R.W. - Neutrophil alkaline phosphatase in Preg-
Read, W.M.F. nancy.
Turvey, P.A. J. Clin. Pathol. 20, No 5, 749 - 51, 1967

- 6) Bennett, J.M. - Significance of Leukocyte Alkaline Phospha-
Nathanson, L. tase in Hodgkin`s Disease.
Rutenberg, A.M. Clin. Res. 15, No 2, 334, 1967

- 7) Bottomley, R.H. - Purification and Properties of Alkaline
Lovig, C.A. Phosphatase from Human Normal and Leukemic
Holt, R. Leukocytes.
Griffin, M.J. Clin. Res. 16, No 2, 299, 1968

- 8) Cohn, Z.A.
Hirsch, J.G. - The isolation and properties of the specific cytoplasm granules of rabbit polymorphonuclear leucocytes.
J. Exp. Med. 112, 983, 1960
- 9) Cohn, Z.A.
Hirsch, J.G. - The influence of phagocytosis on the intracellular distribution of granule-associated components of polymorphonuclear leucocytes.
J. Exp. Med. 112, 1015, 1960
- 10) Ebadi, M.
Mc Coy, E. - Progesterone mediated Increases of Leucocyte Alkaline Phosphatase in Rabbits.
Biochim. Biophys. Acta 130, 502 - 10, 1966
- 11) Groop, A.
Fischer, R.
Niederalt, G.
Klesse, M.P.
Hensen, S. - Philadelphia- Chromosom und Alkalische Leukozyten- Phosphatase bei chronischer Myelose.
Klin. Wschr. 46, No 4, 177- 187, 1968
- 12) Handbuch der Histochemie VII, 1, 119, 1962
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- 13) Hirsch, J. G.
Cohn, Z.A. - Degranulation of polymorphonuclear leucocytes following phagocytosis of microorganisms.
J. Exp. Med. 112, 1005, 1960
- 14) Hook, E.B.
Engel, R.R. - Leucocyte Life- Span, Leukocyte Alkaline Phosphatase and the 21 st chromosome.
The Lancet 1, 112, 1964
- 15) Kallman, F.G. - Substrate specifities and inhibition of intracellular alkaline phos-

phatases associated with cytoplasmic granules sedimented by differential centrifugation.

J. cell. comp. Physiol. 38, 137-56, 1951

- 16) Kaplow, L.S. - A histochemical procedure for localisation and evaluating leucocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and bone marrow.
Blood 10, 439, 1963
- 17) Karlson, P. - Kurzes Lehrbuch der Biochemie
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1970
- 18) Keiser, G. - Die Bedeutung der alkalischen Leukozytenphosphatase.
Schw. Med. Wschr. 97, No 8, 245-49, 1967
- 19) Leuthardt, F. - Lehrbuch der physiologischen Chemie
Walter de Gruyter, 1959
- 20) Levine, B. - Leucocyte Alkaline Phosphatase in
Mandell, G. Gynecologic Cancer.
Lipschutz, D. Amer. J. Obstet. Gynecol. 95, 692-95
Bernstein, G. 1966
- 21) Mc Coy, E. - The paradoxical Effect of Hydrocortisone and Actinomycin D on the Activity of Rabbit Leukocyte Alkaline Phosphatase.
Ebadi, M. Biochem. a. Biophys. Res. Comm. 26, 265- 271, 1967

- 22) Merker, H. - Die alkalische Leukozytenphosphatase, ihre hämatologische und allgemein-klinische Bedeutung.
Dtsch. Med. Wschr. 90, 1965
- 23) Merker, H.
Heilmeyer, L. - Zytoenzymatischer Nachweis und Aktivität der ALP bei Erkrankungen und Reaktionen des blutbildenden Systems.
Dtsch. Med. Wschr. 85, Nr. 7, 1960
- 24) Merker, H. - Die Dynamik der Aktivitätszunahme der alkalischen Neutrophilenphosphatase auf einmalige Gabe von bakteriellem Endotoxin.
7. Tag. Dtsch. Hämat. Ges. 1961, Wiesbaden
- 25) Morton, R.K. - Transferase activity of hydrolytic Enzymes.
Nature 172, 65- 68, 1953
- 26) O`Kell, R.T.
Axon, L.L. - Leucocyte alkaline phosphatase in the newborn infant
Amer. J. Obstet. Gynecol. 93, No 8, 1181, 1965
- 27) Perillie, P.E. - Studies of the Changes in Leucocyte Alkaline Phosphatase following Pyrogen Stimulation in chronic Granulocytic Leukemia.
Blood 29, No 3, 401- 406, 1967

- 28) Plenert, W. - Studien zur Zytochemie der Leukozytenphosphatasen im Kindesalter. III. Mitteilung - Die der ALP- Aktivität (AGP) durch Steroidpräparate. Folia Hämat. 80, 52- 66, 1963
- 29) Quigley, H.J. - The activity of alkaline Phosphatase in Granular Leucocytes during Dawson, E. Pregnancy and the Puerperium: A Hyun, B.H. preliminar Report. Am. J. Clin. Path. 33, No 2, 109- 14, 1960
- 30) Robinson, J.C. - Leukocyte - Alkaline - Isozymes Pierce, J.E. Lancet 1966/ II/ No 7467, 805 Goldstein, D.P. Rosse, W.R.
- 31) Rosen, R.A. - Leucocyte Life- Span and Leucocyte Nishiyama, H. Alkaline Phosphatase Lancet 6, 554, 1965
- 32) Schmidt, H.J. - Untersuchungen des Vaginalepithels der Wistarratte während des Genitalzyklus und bei Vit. A - Mangel. Inaug. Diss. Gießen, 1963
- 33) Siering, H. - Alkalische Leukozytenphosphatase Krause, C. und Tuberkulose Med. Klin. 61, No 7, 251 - 253
- 34) Sramkova, L. - Einfluß von Keuchhusten-, Masern- Lasovska, J. und Pockenschutzimpfung auf die alkalische Phosphatase in Leukozyten. Z. Kinderheilkunde 105, 4, 352-60, 1969

- 35) Sramkova, L. - Die alkalische Phosphatase in neutro-
Prochazkova, E. philen Leukozyten bei Infektions-
krankheiten.
Schweiz. Med. Wschr. 98, No 35, 1325-
29, 1968
- 36) Sramkova, L. - Alkalische Leukozytenphosphatase
Prochazkova, E. bei Meningitis und Meningoencephali-
Novak, M. tis.
Med. Klin. 64, No 39, 1748- 52, 1969
- 37) Sramkova, L. - Die alkalische Leukozytenphospha-
Grantova, H. tase bei Masern
Milek, E. Arch. Kinderheilkunde 177, No 2,
192 - 200, 1968
- 38) Sumner, J.B. - Chemistry and Methods of Enzymes
Somers, G.F. Ed. 3, Academic Press New York,
1953
- 39) Teplitz, R.L. - Regulation of Leucocyte Alkaline
Phosphatase and the Philadelphia-
Chromosom
Nature 209, 821 - 822, 1960
- 40) Trubowitz, S. - Alkaline Phosphatase Activity of
Moschides, E. the Polymorphonuclear Leukocyte
Feldman, D. in rapidly induced Leukopenia
and Leukocytosis
J. Lab. Clin. Med. 57, 747- 54,
1961
- 41) Vakulenko, A.D. - The activity of Alkaline Phosphatase
Shubich, M. G. of Neutrophils in Myeloproliferative
Diseases
Therapevt. Arkh. 38, No 2, 66- 69,
1966

- 42) Valentine, W.N.
Follette, J.H.
Solomon, D.S. - The Relationship of Leucocyte Alkaline Phosphatase to " Stress ", to ACTH and to Adrenal 17- OH- Corticosteroids
J. Lab. Clin. Med. 49, 723-37, 1957
- 43) Wachstein, M. - Alkaline Phosphatase activity in normal and abnormal human blood and bone marrow cells
J. Lab. Clin. Med. 31, 1, 1946
- 44) Weaver, D.D.
Lyons, R.B. - Leukocyte- Alkaline- Phosphatase- Isoenzymes
Lancet 1968/ I/ No 7553, 1196- 97
- 45) Wetzel, B.K.
Horn, R.G.
Spicer, S.S. - Cytochemical Localisation of the non specific Phosphatase Activity in Rabbit Myeloid Elements
J. Histochem. Cytochem. 11, 812-814, 1963
- 46) Boguth, W.
Frenzel, D. - Interferenzmikroskopische Aktivitätsbestimmung der Rattenschilddrüse
Histochemie 5, 135- 140, 1965
- 47) Deutinger- Skrube, H. - Geschlechtsabhängiges Verhalten der Rattenschilddrüse
Hagmüller, H.
Hellauer, H. Pflügers Arch. Europ. J. of Physiol. 303, 2, 1968

Herrn Professor Dr. Dr. W. Boguth danke ich sowohl
für die freundliche Überlassung des Themas als
auch für stete Hilfe und Förderung meiner Arbeit.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des
Institutes, die mich bei meiner Arbeit unterstützt
haben.

Lebenslauf

Am 12. Mai 1944 in Essen- Steele geboren.

Von Ostern 1950 bis Ostern 1954 Besuch der Haferfeld -
Schule in Essen - Steele.

Von 1954 an Besuch der Viktoria- Schule, Städt. Mädchen-
gymnasium in Essen. Februar 1964 Abitur an derselben
Schule.

Zum Sommer- Semester 1964 Immatrikulation an der Veteri-
närmedizinischen Fakultät der Justus Liebig- Universität
in Gießen.

Oktober 1966 Tierärztliche Vorprüfung in Gießen.

Von November 1967 - Juli 1968 wissenschaftl. Hilfskraft
am Institut für Biochemie und Endokrinologie der Justus
Liebig- Universität Gießen.

November 1969 Tierärztliche Prüfung in Gießen.

Die Arbeit entstand in der Zeit von 1967 bis 1970 am
Institut für Biochemie und Endokrinologie der Justus Lie-
big Universität in Gießen.

